

申請日期	78.3.13
案號	78101839
分類	MIN A01K ; C12P

79年3月20日 修正
補充

公告本

(79年3月)

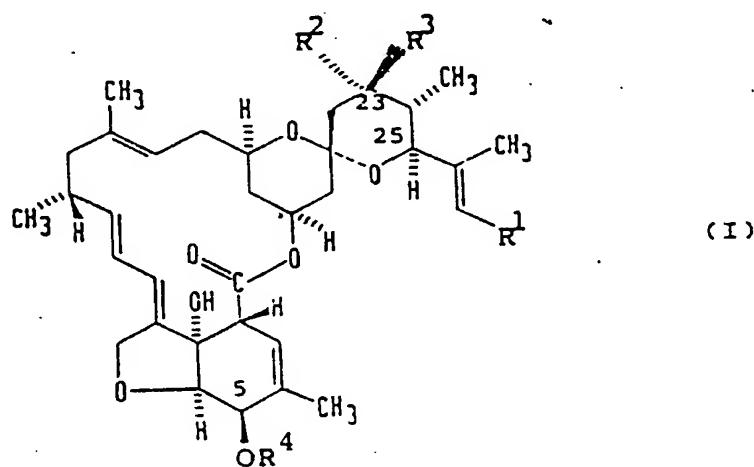
發明專利說明書 (修正本)

一、發明 創作 名稱	大環內酯化合物之製備方法、 "PROCESS FOR THE PREPARATION OF MACROLIDE COMPOUNDS"	
	姓名	1. 布萊安·亞瑟·麥可·洛德 BRIAN ARTHUR MICHAEL RUDD 2. 麥可·文生·約翰·隆沙 MICHAEL VINCENT JOHN RAMSAY
二、發明 創作 人	籍國 (國籍)	英國
	住址	1. 英國密德塞郡哈勞市雷納巷伊塞特路72號 2. 英國密德塞郡南哈勞市金斯路157號
三、申請人	姓名	美國氰胺公司 AMERICAN CYANAMID COMPANY
	籍國 (國籍)	美國
	住址	美國紐澤西州韋恩市氰胺廣場
	代表人 姓名	艾風斯·翁·諾伊 ALPHONSE R. NOE

發明新型之名稱：大環內酯化合物之製備方法

四、摘要说明：

化學式 (I) 之 S541 (LL-F28249) 化合物



〔其中 R' 是甲基、乙基或異丙基； R'' 是氫原子或 OR'' 基團（其中 OR'' 是羥基或經取代的羥基）， R''' 是氫原子，或 R'' 和 R''' 和其所連接之碳原子一齊代表 $>C=O$ ， $>C=CH_2$ 或 $>C=NOR''^6$ （其中 R''^6 代表氫原子， C_1-18 之烷基或 C_3-18 婦基且 $>C=NOR''^6$ 是 E 構型）；及 R''^4 是氫原子或甲基〕，其包括在適當培養基中，於一種微生物或其衍生之酶或衍生自含可使其有效轉化之酶的微生物之製劑存在下，培育一種對應之 5-酮化合物。

附註：本素已向 英 國（地區）申請專利，申請日期： 索號：
1988.3.14 8805978

五、詳細說明（本欄應就發明（創作）之目的，技術內容（特點）及功效依次選項詳細說明）

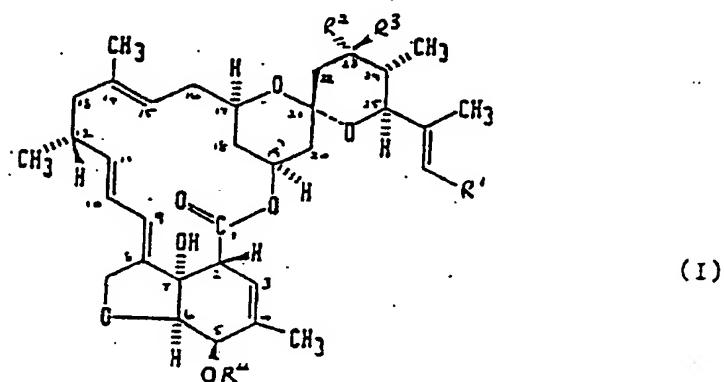
本發明係關於大環內酯化合物之製法。

英國專利說明書 2166436 和歐洲專利說明書 170006 曾描述一群物質（吾等命名為 S541），其可藉屬於熱阿肯西斯鏈絲菌（*Streptomyces thermoarchaensis*）及非氯塞尼肯休斯鏈絲菌（*Streptomyces cyaneoqriseus*）會產生 S541 之菌種發酵而製成。 S541 具有抗一體內寄生虫，抗一體外寄生虫

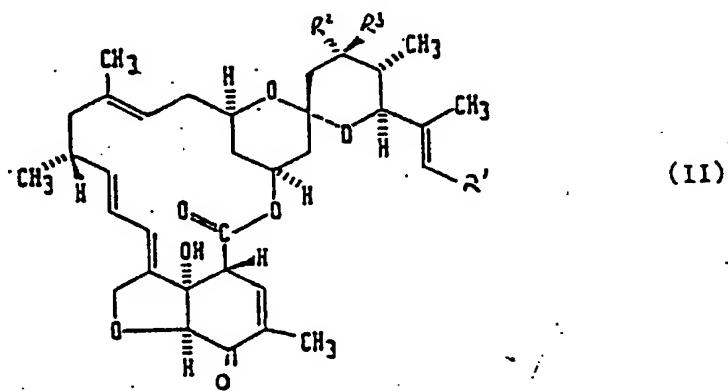
，抗 菌，殺 虫 劑，殺 線 虫，殺 端 劑 的 活 性 並 特 別 應 用 農 業，園 藝，及 動 物 和 人 類 健 康。

我 們 現 已 發 現 製 備 S 5 4 1 化 合 物 及 其 化 學 衍 生 物 之 製 程。

所 以，根 據 本 發 明 之 一 方 面，我 們 提 供 製 備 式 (I) 化 合 物 的 製 法



[其中 R' 是 甲 基，乙 基 或 异 丙 基； R'' 是 氢 原 子 或 OR'' 基 囘 (其中 OR'' 是 羧 基 或 至 多 有 25 個 碳 原 子 之 經 取 代 羧 基)， R''' 是 氢 原 子 或 R'' 和 R''' 與 其 所 连 接 的 碳 原 子 一 耘 代 表 $>C=O$, $>C=CH_2$ 或 $>C=NOR''$ (其中 R'' 代 表 氢 原 子， C_1 —。 烷 基 或 C_2 —。 烯 基 且 $>C=NOR''$ 是 呈 E 式 型；且 R'' 是 氢 原 子 或 甲 基)，其 包 括 在 適 當 培 藻 基 中，於 一 種 微 生 物 或 自 此 微 生 物 衍 生 的 酶 或 自 合 可 有 效 地 進 行 裸 化 之 酶 的 微 生 物 所 衍 生 之 製 剂 存 在 下，培 育 下 式 (II) 化 合 物]



其中 R^1 ， R^2 和 R^3 均如前文定義。

用於本發明方法中之適當微生物及其萃取物可藉經設計用以證實微生物或其萃取物具有將式(II)化合物轉化成式(I)化合物之能力的初步小量測試來確定。式(I)化合物之形成可藉適當反應混合物之層析(如高效率液體層析)來確定。

我們已發現鏈絲菌屬之微生物及其萃取物特別適用於根據本發明之方法。

用於根據本發明方法之特別的鏈絲菌微生物，包括熱阿肯西斯鏈絲菌(*Streptomyces thermoarchaensis*)，非氯塞尼肯休斯鏈絲菌(*Streptomyces cyaneogriseus nancyanogenus*)，艾柏米堤里斯鏈絲菌(*Streptomyces avermitilis*)，及易潮濕鏈絲菌(*Streptomyces hygroscopicus*)亞屬。適當的菌種之特別實例包括熱阿肯西斯鏈絲菌NCB12212和12213[1986年3月6日儲存於英國，愛伯丁(Aberdeen)，國立多倫(Torry)研究站，工業及海上菌類保存所之永久培養物保存中]及這些菌種之變異株，艾柏米堤里斯鏈絲菌ATCC31272和31780及易潮濕鏈絲菌亞屬，金黃色雷克

蕊邁斯 (aureolacrimosus) FERM P1438 。

上述菌種之變異株可自行產生或藉包括描述於英國專利說明書 2166436 及歐洲專利說明書 170006 之各種方法製備。

用於根據本發明方法之適當酶可衍生自相當廣範圍的來源。然而，上述鏈絲菌微生物係代表可將式 (II) 化合物轉化成式 (I) 化合物之特別適當的酶來源。

根據本發明方法之一項具體實施例中，將溶於適當溶劑之式 (II) 化合物加至含上述微生物且於碳，氮和無機塩類之可吸收來源存在下的發酵培養基中，可達成式 (II) 化合物之轉化成對應之式 (I) 5-O-R' 化合物。

碳，氮和無機塩之可吸收來源可用簡單或複雜養份供應。碳的來源通常包括葡萄糖，麥芽糖，澱粉，甘油，糖蜜，糊精，乳糖，蔗糖，果糖，碳酸，胺基酸，甘油酯，醇，烷和植物油。碳來源通常含 0.5 至 10 重量% 發酵培養基。

氮來源通常包括大豆粉，玉米分泌液，蒸餾的可溶物，酵素萃取物，棉子粉，蛋白，落花生粉，麥芽萃取物，糖蜜，酪蛋白，胺基酸混合物，氮（氣體或溶液），銨鹽或硝酸鹽，尿素和其他醯胺亦可使用。氮來源通常含 0.1 至 10 重量% 發酵培養基。

可混入培養基中之無機塩養份包括可產生鈉、鉀、銨、鐵、鎂、鋅、鎳、鈷、錳、鉻、鎘、鈣、銅、鉬，硼、磷酸鹽，硫酸鹽，氯和碳酸等離子之常用塩類。

可存有抗泡劑以控制過多泡沫並視須要間隔加入。

培養開始時，或較通常是，當培養開始後，如 2 - 4 天，微生物成長期間，可加入溶於下列溶劑之式 (II) 化合物，如和水共溶之有機溶劑（如：醇，譬如甲醇或 2 - 丙醇，二元醇，如 1, 2 - 丙二醇，1, 3 - 丁二醇；酮，如丙酮；腈如甲腈；醚，如四氫呋喃或二氫陸國；經取代醯胺，如二甲基甲醯胺或二烷基亞碩，如二甲亞碩）。

生物培養通常是在攝氏 20 至 50 度，較佳是攝氏 25 至 40 度的溫度中較有效且用充氣和攪動，如搖動或攪拌進行。培養基起先可用少量的芽胞微生物懸浮液接種，但為避免成長遲滯，生物具生長力之接種菌可用芽胞態生物接種少量培養基而製備，且所得之具生長力之接種菌可轉移至發酵培養基，或較佳是，轉移至 1 或多個種子片內（即在轉移至主要發酵培養基前，菌種發生進一步成長的地方）。發酵通常是在 P H 5.5 至 8.5，較佳是 5.5 至 7.5 間進行。

當式 (II) 化合物已加入培養時，通常要溫和的混合，繼續培養以使必要產物積聚。發酵培養液內之產物存在量可藉高效率液體層析及紫外光分光計於波長 238 毫微米下追蹤萃取物來測定。

產物和整個發酵培育液可藉傳統分離方法和英國專利說明書 2166436 和 2176182 所描述之分離技術分離。

根據本發明方法之另一具體實施例中，式 (II) 化合物

之轉化成對應之式 (I) $5-O-R'$ 合物可在，例如，攝氏 0 至 60 度，較佳是攝氏 20 至 40 度，如大約攝氏 28 度時，將溶於適當溶劑中（如前述和水可互溶之有機溶劑）的式 (II) 化合物與（最好是溶於緩衝液中）本發明之酶製劑合併並培育。此反應通常是在 PH 3.5 至 8.5，如 5.5 至 7.5 間進行。如果須要，反應可在，如 NADH 或 NADPH 等輔因子，存在下進行。當反應完成時，意即當式 (II) 化合物不再轉化成本發明化合物時（用高效率液體層析和紫外光分光計在波長 238 毫微米下監視反應混合物之萃取物），用傳統分離法和英國說明書 2166436 及 2176182 中所述之分離技術回收產物。

用於本發明方法中之酶，可藉例如培養在營養培養基內且可製造此酶之微生物製備。適合製備此酶的營養培養基和發酵條件包括先前所述於微生物存在時，用式 (II) 化合物製備式 (I) 化合物所用之培養物。酶活性達到最高值的時間當然會隨使用之微生物的不同而改變，因此，適當的培養時間須視使用之菌種而個別決定。

對於酶是細胞外的微生物，除去整個細胞之液體培養基或濾液可做為酶來源。當酶與細胞結合者，在細胞分散於適當緩衝液後可藉傳統方法，如音波法，用玻璃珠磨碎，均質化作用，用細胞溶解酶或清潔劑處理使其釋出使用。

所得之製劑，無論有或沒有除去細胞碎渣，皆可做為酶來源

。然而，較佳是藉傳統方法進一步純化。可簡易使用離子交換纖維素或親和吸附劑或其他吸附劑，如羟化鈣磷酸鹽（hydroxylapatite）之分批或管柱層析。另外，酶可藉分子篩技巧，如超過濾或鹽析，濃縮或進一步純化。通常，在純化過程期間，須要將 PH 保持於 3 至 11。

酶可用一種固定形態，如藉不能溶解作用或包於適當基質內或其上。因此，酶的萃取物可被結合或連接於其他惰性無機或有機聚合體，包在纖維內或其上，或在如聚丙烯醯胺膠體之薄膜或聚合物內或上，吸附在離子交換樹脂上，以譬如戊二醛之試劑交聯或包容於如珠狀物之殼內。固定化酶可便利的使用於批次方法（在酶可再使用之後）及連續流動方法，其中基質流經含固定化酶的管柱。

當 R^5 存在於式（I）化合物中時， R^5 可代表醯基，如化學式為 R^7CO- ， R^7OCO- 或 R^7OCS- 之基團（其中 R^7 是脂族、芳脂族、或芳香基，例如，烷基，烯基，炔基，環烷基，芳烷基或芳基），甲醯基，如上文關於 R^7 所定義之 R^8 基， R^9SO_2- 基（其中 R^9 是 C_1 —，烷基或 C_6-C_2 。芳基），矽烷基，環狀或非環狀縮醛基， $-CO(CH_2)_nCO_2R^{10}$ （其中 R^{10} 是氫原子或如上述 R^7 所定義之基團且 n 代表 0，1 或 2），或 $R^{11}R^{12}NCO-$ 基（其中， R^{11} 和 R^{12} 可分別代表氫原子或 C_1 —，烷基）。

其中 R^5 或 R^8 是烷基，它們可以是，例如 C_1 —，烷基，如甲基，乙基，正一丙基，異一丙基，正一丁基，異

一丁基，第三丁基或正一庚基，這些烷基亦可經取代。若 R^7 是經取代的烷基時，它可被，例如，1或多個，如2或3個，鹵原子（如，氯，溴原子）或羧基， C_1 —，烷氧基（如甲氧基，乙氧基），苯氧基或矽烷氧基所取代。當 R^8 是經取代的烷基時，它可被環烷基，如環丙基所取代。

當 R^7 和 R^8 是烯基或炔基時，它們較佳是含2—8個碳原子，當 R^7 和 R^8 是環烷基時，它們可以，例如，是 C_3 — C_2 環烷基，如 C_3 —，環烷基，如環戊基。

當 R^7 和 R^8 是芳烷基時，它們較佳是烷基部份有1—6個碳原子，芳基可以是碳環或雜環且較佳是含4—15個碳原子，如苯基。此基之實例是苯 C_6 —。烷基，如平基。

當 R^7 和 R^8 是芳基時，它們可以是碳環或雜環且較佳是含4—15個碳原子，例如苯基。

當 R^5 是 $R^9SO_2^-$ 基時，例如它可以是，甲基磺醯基或對甲苯磺醯基。

當 R^5 是環縮醛基時，它可以是例如5—7員環，如四氫哌喃基。

當 R^5 是矽烷基或 R^7 含矽烷氧取代基時，矽烷基可攜帶3個相同或不同之基團，此基團係選自烷基，烯基，烷氧基，環烷基，芳烷基，芳基和芳氧基。這些基可如上所定義且特別包括甲基，第三丁基，苯基，此矽烷基之特別實例是三甲基矽烷基和第三丁基二甲基矽烷基。

當 R^5 是 $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{R}^{10}$ 時，它可以是例如 $-\text{COCO}_2\text{R}^{10}$ 或 $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}^{10}$ ，其中 R^{10} 是氫原子或 $\text{C}_1\text{--C}_4$ 烷基（如甲基或乙基）。

當 R^6 是 $\text{R}^{11}\text{R}^{12}\text{NCO}-$ ， R^{11} 和 R^{12} ，例如，可分別是氫原子，甲基或乙基。

當 R^6 是 $\text{C}_1\text{--C}_4$ 烷基時，例如，它可以是甲基，乙基，正丙基，異丙基，正丁基，異丁基或第三丁基，且較佳是甲基。

當 R^6 是 $\text{C}_1\text{--C}_4$ 烯基時，例如，它可以是烯丙基。

可根據本發明方法製備之較佳式（I）化合物包括化合物中之 R^1 是異丙基的化合物。

可根據本發明方法製備之重要式（I）化合物包括其中 R^2 是羥基或乙氧基且 R^3 是氫原子；或 R^2 和 R^3 分別代表氫原子；或 R^2 和 R^3 及與其連接之碳原子一齊代表 $>\text{C}=\text{O}$, $>\text{C}=\text{CH}_2$ 或 $>\text{C}=\text{NOCH}_3$ ，之化合物。

可根據本發明方法製備之特別重要式（I）化合物是化合物中：

R^1 是異丙基， R^2 和 R^3 及與其連接之碳原子一齊代表 $>\text{C}=\text{NOCH}_3$ 且 R^4 是氫原子；

R^1 是異丙基， R^2 ， R^3 和 R^4 是氫原子；及

R^1 是異丙基， R^2 是羥基， R^3 和 R^4 是氫原子。

式（II）中 R^1 是甲基，乙基或異丙基， R^2 是羥基及 R^3 是氫原子的化合物曾描述於英國專利說明書 2 1 8 7 7 4 2 A 中。式（II）之其他化合物係描述於歐洲專利說明書

0 2 3 8 2 5 8 A 1 中。

下列製備法與實例係用以說明本發明，其中所有溫度以攝氏為單位且“L”表示升。下列實例中之hplc（高效率液體層析）是在球吸附（Spherisorb）550DS-2（150毫米x2.1毫米）之管柱上進行並且，除非有另外說明，否則均以流速0.5毫升／分之乙腈／水（3:1）當溶離液，管柱流出物藉芬尼根（Finnigan）移動帶和芬尼根MAT4500質譜儀（用電子離子化當偵測器）連接。下列製備之化合物是參照已知之母“因子”，因子A，而命名。因子A（描述於英國專利說明書2166436中）是式（I）中R¹為異丙基，R²為羥基且R³和R⁴是氫原子的化合物。

中間體 1

5-酮基因子A，按英國專利說明書2187742A實例2中所述之方法製備。

中間體 2

5,23二酮基因子A，按歐洲專利EP-A1238258實例2中所述之方法製備。

中間體 3

5-酮基因子A 23-乙基醚，按歐洲專利EP-A1238258實例7中所述之方法製備。

中間體 4

5-酮基因子A 23-一半草酸

將5-酮基因子A（330毫克），細磨之碳酸鈣（200

毫克），草醯氯（0.07 毫升）在無水二氯甲烷（5 毫升）中一齊攪拌 10 分鐘。再加入 2 N 塩酸（4 毫升），5 分鐘後，加入乙酸乙酯。收集有機相，乾燥，蒸發，將殘留物溶於二異丙基醚中，用石油醚（沸點攝氏 40 至 60 度）稀釋此溶液，沉澱得到白色毛狀固體之標題化合物（262 毫克）， $[\alpha]_D^{24} +120^0$ ($\text{c} 0.6, \text{CHCl}_3$), $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}} 240\text{nm}$ ($E' 425$), $\nu_{\text{max}} (\text{CHBr}_3) 3440$ (OH), 1800 (CO_2H 二聚物), 1720 (酯), 及 1676cm^{-1} (α, β - 不飽和酮)，包括 6.52 (窄，多，1 H), 5.07 (4, 3 赫茲, 1 H), 3.78 (單, 1 H), 1.83 (單, 3 H), 及 0.71 (双, 7 赫茲, 3 H)

中間體 5

5 - 腈基 2 3 [E] - 甲氨基亞胺基因子 A，按歐洲專利 E P - A 1 2 3 8 2 5 8 實例 1 6 所述之製程製備。

實例 1

(a) 用熱阿肯西斯鏈絲菌 N C I B 1 2 2 1 3 [如英國專利申請案 2 1 8 7 7 4 2 A 實例 2 製備熱阿肯西斯鏈絲菌 N C I B 1 2 0 1 5 之製程製備] 之芽胞懸浮液接種含培養液 A (2.5 毫升) 之圓底燒瓶：

培養基 A

克升⁻¹

D-葡萄糖

麥芽糊精 MD 30E (洛葵梯 (Roquette) (英國) 有限公司) 12.5

阿肯豆 (Arkasoy) 5.0 (英國阿凱弟有限公司) 12.5

糖蜜

K₂HPO₄

碳酸鈣

MOPS (3-(N-嗎福啉基 (morpholino)丙基磺酸) 21.0

[壓熱前，蒸餾水稀釋至 1 升，用 5N NaOH 調 pH 至 6.5] 。

培養物在攝氏 31 度下，於旋轉搖動器 (250 轉 / 分) 上培養 4 天，將溶於二甲基亞碩 (0.05 毫升) 之中間體 1 (1 毫克) 加入。培養物再於攝氏 31 度中培養 24 小時，離心 (大約 10000 rpm / 10 分)，除去上層清液，將 (1.8 毫升) 甲醇加至殘留物中。將所得懸浮液於室溫中靜置 1 小時再離心。

用 hplc 分析上層清液，並將結果和英國專利說明書 2166436 之權威樣本比較。式 (I) 化合物之測試樣本中，R' 是異丙基，R'' 是羥基，R''' 是氫原子，R'''' 是氫原子 [3.3% - % 是加入原始物中轉化成產物之 %] 。

(b) 用艾柏米堤里斯鏈絲菌 A T C C 31780 和中

間體 1 重複 (a) 部分，所得之萃取物，由 hplc 分析顯示式 (I) 化合物中，R' 是異丙基，R'' 是羥基，R''' 是氫原子和 R'' 是氫原子 [8.6% - % 如 (a) 部份所述]。

(c) 和 (a) 部份相似之方法，用熱阿肯西斯鏈絲菌 N C I B 1 2 2 1 2 培養中間體 1，但培養物是芽胞懸浮液加至培養液 A，如前所述 3 天之培養期後使用 (0.1 毫升轉移) 為接種新鮮部份之相同培養基 (2.5 毫升) 中製備。2 天後，將中間體 1 (1 毫克溶於 0.05 毫升二甲基亞砜中) 加至後來之培養物中，在開始收獲前，培養物再培養兩天，用 (a) 部份所述之方法萃取及分析。測試樣本的 hplc 分析顯示化學式 (I) 化合物中，R' 是異丙基，R'' 是羥基，R''' 是氫原子且 R'' 是氫原子 [5.1% - % 如 (a) 部份所述]

實例 2

(a) 用熱阿肯西斯鏈絲菌 N C I B 1 2 2 1 3 [如實例 1 所述之方法製備] 之芽胞懸浮液 (0.4 毫升) 按量含培養液 A (2.5 毫升) 之 250 毫升搖動圓底燒瓶。培養物在攝氏 28 度之旋轉搖動器 (250 轉 / 分) 中培養 2 天。2 天後，部份 (5 毫升) 培養物加至 50 毫升搖動圓底燒瓶中，加入溶於甲醇 (50 微升) 之 20 毫克 / 毫升之中間體 2。培養物在相同條件下再培養 2 - 3 天。搖動所得懸浮液 1 小時並離心。用 hplc / 質譜儀分析上層清液。遲滯時間 3 分鐘之吸收峰用質譜儀分析的結果及與 U K

專利申請案 2 1 7 6 1 8 2 所述之權威樣本比較知式 (I) 化合物中，R' 是異丙基，R'' 和 R''' 及與其連接之碳原子一齊形成 $>\text{C}=\text{O}$ ，且 R $''''$ 是氫原子。

(b) 用熱阿肯西斯鏈絲菌 N C I B 1 2 2 1 3 和中間體 3 重複 (a) 部份，所得之萃取物由 hplc / 質譜儀 (用甲基腈 / 水 9 : 1 當溶離液) 分析及與 U K 專利申請案 2 1 7 6 1 8 2 所述之權威樣本比較顯示式 (I) 化合物，R' 是異丙基，R'' 是乙氨基，R''' 是氫原子且 R $''''$ 是氫原子。

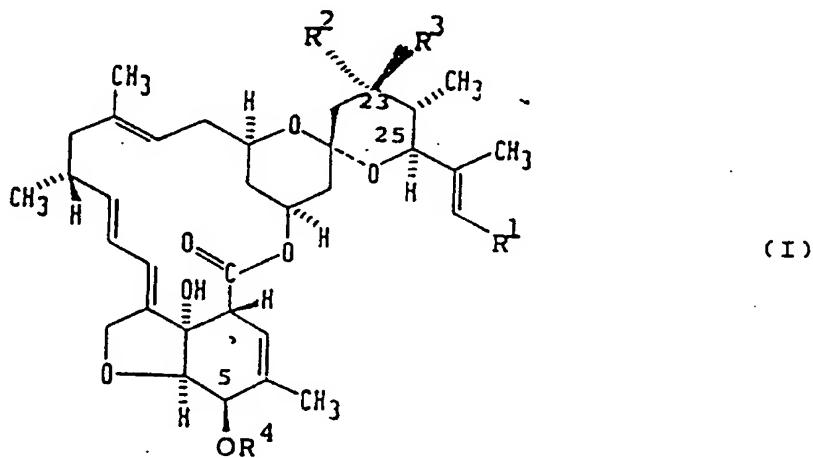
(c) 用熱阿肯西斯鏈絲菌 N C I B 1 2 2 1 3 和中間體 4 重複 (a) 部份，所得之萃取物由 hplc 分析及與 U K 專利申請案 2 1 7 6 1 8 2 所述之權威樣本比較顯示式 (I) 化合物中，R' 是異丙基，R'' 是 $-\text{OCOCO}_2\text{H}$ ，R''' 是氫原子，R $''''$ 是氫原子。

(d) 用熱阿肯西斯鏈絲菌 N C I B 1 2 2 1 3 和中間體 5 重複 (a) 部份，所得萃取物由 hplc 分析及與 U K 專利申請案 2 1 9 2 6 3 0 A 所述之權威樣本比較顯示式 (I) 化合物中，R' 是異丙基，R'' 和 R''' 及與其連接之碳原子一齊代表 $>\text{C}=\text{NOCH}_3$ 且 R $''''$ 是氫原子。

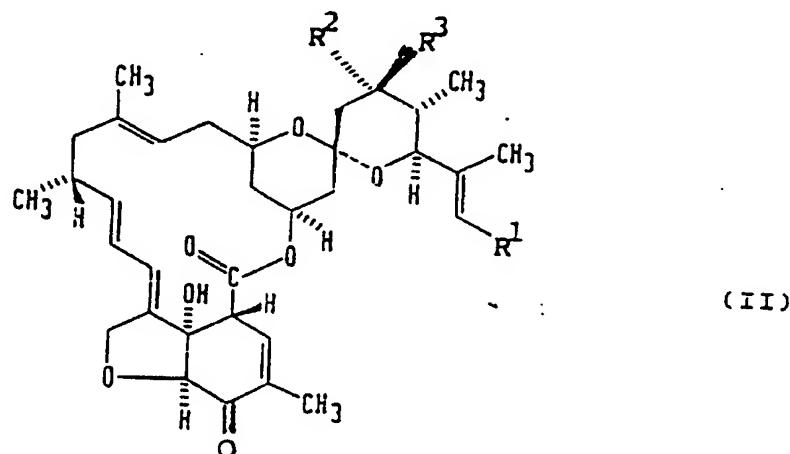
自分析的 hplc 分離出之樣本，其電子離子化的質譜圖得到 6 3 9 之分子離子且在 6 2 1，5 2 7，5 1 1，4 9 6，4 4 8，4 3 4，3 6 8，2 6 4，2 4 8 和 1 5 1 中有特性的鍵段。

六申請專利範圍

1. 式(I)化合物之製法



〔其中，R¹是甲基，乙基或異丙基；R²是氫原子或OR⁵基（其中OR⁵是羥基或至多有25個碳原子之經取代的羥基），R³是氫原子或R²和R³及與其連接之碳原子一齊代表>C=O，>C=CH₂或>C=NOR⁶基，其中R⁶是（氫原子，C₂-一。烷基或C₃-一。烯基，且>C=NOR⁶是E構型）；及R⁴是氫原子或甲基〕，此方法包括於pH 5.5至8.5及溫度20~50°C下將在適當溶劑中之式(I)化合物加至含一種微生物或由其衍生之酶，且碳，氮及無機鹽可吸收來源存在下之發酵媒質中存在下，培育下式(II)化合物：



[其中， R^1 ， R^2 和 R^3 如上所定義]，該微生物係選自熱阿肯西斯鏈絲菌 N C I B 1 2 2 1 2 和 1 2 2 1 3 及這些菌種之變種，艾柏米湜里斯鏈絲菌 A T C C 3 1 2 7 2 或 3 1 7 8 0 或易湖濕鏈絲菌亞屬金黃色雷克遜斯 F E R M P 1 4 3 8。

2. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其是於 P H 5 . 5 至 7 . 5 和 2 5 至 4 0 °C 之溫度中進行。
3. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中式 (I) 和式 (II) 中之 R^1 是異丙基。
4. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中式 (I) 和式 (II) 中之 R^2 是羈基或乙氧基且 R^3 是氫原子；或 R^2 與 R^3 各表示氫原子；或 R^2 與 R^3 及其所連接之碳原子一齊代表 $>C=O$ ， $>C=CH_2$ 或 $>C=NOCH_3$ 。

5. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中式(I)：

R' 是異丙基， R'' 和 R''' 及與其連接之碳原子一齊
代表 $>C=NOCH_3$ 且 R'' 是氫原子；

(R' 是異丙基， R'' ， R''' 和 R'''' 是氫原子；或)

R' 是異丙基， R'' 是羥基， R''' 和 R'''' 是氫原子。)